

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) . Int. Cl.⁷
C07K 14/47

(45) 공고일자 2005년01월26일
(11) 등록번호 10-0468225
(24) 등록일자 2005년01월17일

(21) 출원번호	10-2002-0012409	(65) 공개번호	10-2003-0073037
(22) 출원일자	2002년03월08일	(43) 공개일자	2003년09월19일

(73) 특허권자 (주)뉴로체넥스
 서울 관악구 신림동 산56-1 서울대학교 유전공학특화창업보육센터 312호

(72) 발명자 신동승
 서울특별시 관악구 봉천본동 두산아파트 108-2104

박재용
 서울특별시 영등포구 당산동3가 평화아파트 C-201

손호선
 서울특별시 관악구 봉천본동 두산아파트 107-1205

강 안토니
 서울 관악구 봉천5동 관악드림타운 110-1602

정연철
 서울특별시 관악구 봉천5동 삼성아파트 133-1801

김경진
 서울특별시 서대문구 대현동 럭키아파트 104-1102

(74) 대리인 남상선

신사관 : 박정웅

(54) 형광강도가 증강된 삽입형 녹색 형광 단백질 및 그유전자

설명

본 발명은 변종 녹색 형광 단백질 유전자 및 그 발현산물인 형광단백질 (*inserted YFP*)에 관한 것으로서, 외래의 단백질이나 단백질 부위 (*domain*)를 코딩하고 있는 염기서열을 삽입하여도 그 발현 산물이 37°C에서 형광을 유지하고 기존의 동종 단백질에 비해 20배에 달하는 형광 강도를 보임을 그 특징으로 하고 있다.

본 발명에서는 특정한 아미노산 서열을 형광 단백질 내에 삽입할 수 있도록 하기 위하여, DNA 염기서열상에서 특별히 목적한 돌연변이를 도입할 수 있도록 고안된 프라이머를 제조하였고, 이를 이용해서 돌연변이 유발형 PCR (*error prone PCR*)을 수행하고 이를 포유동물 세포주에서 유전자 운반체로 사용되는 *pcDNA3*에 클로닝하였다. 제조된 변종 녹색 형광 단백질 유전자를 세포내에 도입하고 그 형광의 강도가 강하게 유지되는 변종 형광단백질을 선별함으로써 여러 염기서열의 삽입이 가능하고, 그 발현산물이 강한 형광을 잃지 않는 변종유전자 및 그 변종 녹색 형광 단백질을 발명하게 되었다.

내포문

도 1a

의인어

녹색 형광 단백질(GFP), 황색 편이 녹색 형광 단백질(YFP), 삽입(insertion), 삽입형광단백질(inserted YFP), 단백질 분해 효소(protease), 단백질 분해 효소 기질(protease substrate), 절단 부위(cleavage domain), 단백질 결합 부위(binding domain), C형 간염바이러스(HCV), NS3단백질 분해 효소(NS3 protease)

발명

도면의 간단한 설명

도 1a는 혈관(HeLa) 세포에 제조된 삽입형광단백질을 도입한 후 공조점 현미경으로 촬영한 A) Citrine-Ins, B) Y-Citrine, C) Peridot, D) Y-Citrine-5AB, E) Peridot-5AB의 형광사진
도 1b는 도 1a의 이미지를 정량화하여 제조된 삽입형광단백질들의 형광 강도를 비교한 그림

발명의 실체와 설명

발명의 주제

발명의 속개

본 발명은 외부의 염기서열을 삽입함으로써 삽입된 염기서열의 세포내에서의 역할을 규명할 수 있도록 사용할 수 있는 형광 단백질에 관한 것이다.

녹색 형광 단백질 (GFP)은 유전자의 발현과 그 발현 산물인 단백질의 양적, 위치적 특성을 보고하는 리포터로서 광범위하게 사용되고 있으며 활용분야가 급격히 증가되고 있다. 다양한 목적에 적용되어 오면서 그 특성에 맞도록 고안된 새로운 변종 녹색 형광 단백질들이 만들어져 오고 있었다.

1998년 폭스포드그룹에서 녹색형광단백질 (GFP)내의 여러 위치에 외부 단백질이나 펫타이드를 삽입하여도 그 형광을 유지한다는 보고 (NAR 26:623-630)가 있은 후에, 웨인(R.Tsien) 그룹 등에서 보고한 삽입형광단백질 계열의 분자들이 사용되고 있다. 특히 웨인 그룹에서 보고하고 있는 삽입형광단백질의 경우 와이에프피인스(YFPins)와 여기에 칼모들린이 삽입된 카가루(Camgaroo) 등이 있다. 기존의 삽입가능한 녹색 형광 단백질의 경우 1999년에 천 등이 발표한 논문에 따르면 145번 아미노산인 티로신(Tyrosine)이 GGTGEL이라는 아미노산 서열로 변경되었고, 이부분에 도입된 KpnI,SacI 제한효소를 이용함으로써 외래의 염기서열을 클로닝 하도록 하였다 (PNAS 96:11241-11246). 이들에 의해서 만들어진 변종 형광 단백질은 37°C에서 형광을 거의 보이지 못하고 있었고, 28°C에서 형광을 보이는 특성을 보이고 있었다. 때문에 포유동물 세포주에서의 여러가지 세포내 활성을 측정하는 데에는 사용할 수 없다는 단점을 보이고 있었다. 같은 그룹에 따르면 이 카가루(Camgaroo)를 돌연변이를 유발시켜 얻은 69번 아미노산인 글루타민이 베치오닌으로 변한 Q69M돌연변이는 37°C에서 형광을 보이고 있는 것으로 보고되었다 (JBC,276:29188-29199).

4).
본 발명자 등이 동일한 유전자를 제조하여 포유동물세포에 도입한 후 공조점 현미경으로 상을 잡아 본 결과 그 형광 강도가 매우 미약하여서 단백질의 결합 부위를 삽입하여 그 결합성의 변화를 보고자하는 연구나, 단백질 분해 효소에 대한 절단 부위를 삽입하는 등의 활용, 그리고 세포내의 칼슘 농도 측정 등이 거의 불가능함을 알 수 있었다. 따라서 외래 유전자의 삽입을 통한 연구가 현실적으로 가능하려면 세포내 단백질의 형광 강도가 현저히 증가된 변종을 선별하고 이에 관한 연구가 선형되어야 했다.

본 발명은 이에 관한 것으로서 기존의 변종 단백질에서 제외되었던 145번 아미노산인 티로신을 도입하고 pcDNA3 운반체에 효율적으로 클로닝할 수 있도록 두 개의 제한효소 인자 부위(BamHI, 및 NheI)를 도입하고 동시에 적절한 펫타이드 연결 부위를 도입할 수 있도록 프라이머를 디자인 하였고, 이를 사용하여 돌연변이를 많이 유발할 수 있도록 하는 퍼시알 클로닝을 수행함으로써 빛이 강하게 유풀되는 변종 형광 단백질을 개발하고자 하였다.

이 방법으로 선별된 변종 형광 단백질은 145번 아미노산 부위에 YGGSGAS라는 아미노산 서열을 갖는 특징이 있다. 이러한 특징을 갖는 변종 형광 단백질을 와이시트린 (Y-Citrine)이라 명명하였다. 이 부위는 기존의 변종 형광 단백질의 펫타이드 연결 부위와 비교하여 전기생성질을 거의 미지 않고, 연결부위로서 작용할 수 있도록 고안되었고, 염기서열 상에서 유전자 운반체에 존재하지 않는 제한 효소 인자 부위를 가지게 됨으로써 사용하는 유전자 운반체에 서의 클로닝작업을 일회로 마칠 수 있는 특성을 가지게 된다.

또한 이 과정에서 새로운 돌연변이가 유발된 변종을 선별하였는데 이에 변종단백질은 와이시트린이 가지고 있는 돌연변이 외에 192번 아미노산이 프롤린에서 라이신(P192L)으로 변이 된것을 확인하였고 이를 페리도트(Peridot)이라 명명하였다. 이는 와이시트린과 더불어 또 다른 삽입형 형광 단백질로서의 활용을 가능하게 해주는 것이었다.

본 발명에서 보여주고 있는 이 두종의 형광 단백질은 기존의 변종 형광 단백질에 비해 공조점 현미경에서 약 20배의

형광 강도를 보이고 있는 것으로 측정되었고, 이는 세포 수준의 약효평가에 사용할 수 있는 새로운 리포터의 출현을 의미하는 것이라 할 수 있다. 이렇게 세로이 만들어진 리포터 단백질을 이용하여 그 삽입부위에 단백질 분해 효소의 절단 부위, 단백질 결합부위 등을 삽입하고 그 산물의 형광을 분석함으로써 세포내에서 벌어지는 다양한 생명현상을 분석할 수 있는 길을 열어 놓은 것이라 할 수 있다.

발명에 야구고사 하는 기술적 개체

본 발명에서 개발하고자 한 것은 형광의 강도가 증강된 삽입형 황색 편이 녹색 형광 단백질 (*inserted YFP*)의 개발이다. 이를 위해서는 세로운 높은 형광 강도를 보이는 돌연변이의 선별, 펙타이드 연결부위의 엔지니어링, 간편한 클로닝을 위한 제한효소 인지부위의 도입등이 필요하였다.

발명의 구성 및 작용

본 발명은 간편한 클로닝을 위해 제한 효소 인지 서열 (*BamHI* 및 *NheI*)를 도입하였다. 이는 현재 사용하고 있는 포유동물 세포용 유전자 운반체인 pcDNA3에는 존재하지 않는 제한 효소 인지부위이다. 이 제한 효소 인지부위를 포함하는 *YGGSGAS*의 펙타이드 연결부위를 삽입하였다. 이 펙타이드 연결부위는 기존의 GGTGEL에 비해 전기적 성질을 최소화 하였고 이로 인한 구조적 변화를 줄이고자 하였다.

또한 이 변이와 PCR 과정을 통해 도입된 세로운 돌연변이에 의해 강한 형광을 보이는 변종 형광 단백질을 포유동물 세포주인 헬라 (*HeLa*) 세포주에서 선별함으로써 발명을 완성할 수 있었다. 도 1a에 나타낸 바와 같이 세로이 제조된 삽입형광단백질은 기존의 체 그룹의 삽입형광단백질인 시트린인스 (*Citrine-ins*)에 비해 현저히 증강된 형광 강도를 보임을 이미지를 통해 알 수 있었고, 도 1b에 나타난 바와 같이 이를 광초점 현미경 하에서 정량한 결과 20배 정도의 형광 강도를 보이는 것을 알 수 있었다.

이들 선별된 변종 형광 단백질을 와이셔트린과 페리도트의 삽입부위에 사람의 C형 간염 바이러스의 단백질 분해효소 (*protease*)인 NS3 단백질에 의한 절단 부위의 하나인 5AB 연결부위의 염기서열을 삽입하였을 때에도 그 형광을 유지하였고 이를 통해 세포수준에서의 C형 간염 바이러스의 단백질 분해효소의 활성을 평가할 수 있는 방법의 개발 등을 가능하게 하였다.

발명의 효과

본 발명은 포유동물 세포내에서 (37°C) 기존의 동종 단백질에 비해 그 형광강도가 20배에 달하는 삽입형광단백질을 개발함으로써 다양한 단백질 부위의 삽입을 통한 연구를 현실화 할 수 있었다는 것과 포유동물 세포형 유전자 운반체에서의 클로닝이 한 단계로 간편해졌다는 것을 특징으로 한다.

제조된 변종 형광단백질의 삽입부위에 C형 간염바이러스의 NS3 단백질 분해 효소(*protease*)의 절단부위인 5AB를 삽입하였을 때에도 그 형광을 유지한다는 데에서 5AB삽입형광단백질(Y-Citrine-5AB 및 Peridot-5AB)을 기질로 이용하는 C형간염 바이러스 단백질 분해효소 활성 분석 시스템(HCV protease assay system)의 개발이 가능해졌음을 알 수 있다.

(57) 칭구의 범위

청구항 1.

서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 삽입형 형광단백질.

청구항 2.

제 1항의 형광단백질을 코딩하는 서열번호 1의 유전자 염기서열.

청구항 3.

삭제

청구항 4.

제 1항에 있어서, 제 192번 아미노산이 프롤린에서 라이신으로 치환됨 (P192L)을 특징으로 하는 형광단백질.

청구항 5.

제 4항의 형광단백질을 코딩하는, 서열번호 3의 유전자 염기서열.

청구항 6.

삭제

청구항 7.

제 1항 또는 제 4항에 있어서, 사람 C형 간염 바이러스의 NS3 단백질 분해효소 (HCV NS3)의 절단부위가 삽입됨을 특징으로 하는 삽입형 형광단백질.

청구항 8.

제 2항 또는 제 5항에 있어서, 유전자 클로닝을 위한 *BamHI* 및 *NheI*의 제한효소 인지 부위가 삽입됨을 특징으로 하는 유전자 염기서열.

청구항 9.

제 7항의 삽입형 형광단백질을 단백질 분해효소의 기질로서 사용하여 C형 간염 바이러스 단백질 분해효소의 활성을 분석하는 방법.

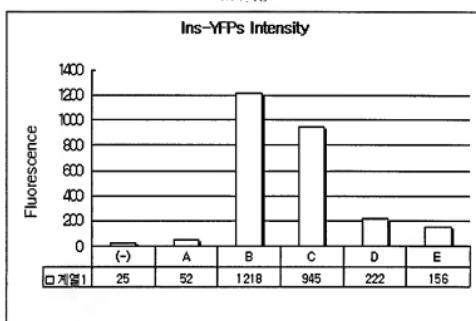
도면

도면 1a



A) B) C) D) E)

도면 1b



<110> NEUROGENEX Co.Ltd. <120> Enhanced inserted YFP <160> 4 <170> KopatentIn 1.71 <210> y
 1 <211> 738 <212> DNA <213> Aequorea victoria <220> <221> CDS <222> (1)..(735) <223>
 -citrine DNA sequence <400> 1 atg gtg aag ggc gag gag ctg ttc acc ggg gtg gtg ccc atc ctg
 48 Met Val Ser Lys Gly Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu 1 5
 10 15 gtc gag ctg gac ggc gac gta aac ggc cac aag ttc agc gtg tcc ggc
 96 Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly 20
 25 30 gag ggc gag ggc gat gec acc tac ggc aag ctg acc ctg aag ttc atc
 144 Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile 35
 40 45 tgc acc acc ggc aag ctg ccc gtg ccc tgg ccc acc ctc gtg act ac
 c 192 Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr 50
 55 60 ttc ggc tac ggc ctg atg tgc ttc gcc egc tac ccc gac cac atg
 agg 240 Phe Gly Tyr Gly Leu Met Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys 65
 70 75 80 cag cac gac ttc aag tec gec atg ccc gaa ggc tac gtc
 cag gag 288 Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
 85 90 95 cgc acc atc ttc ttc aag gac gac ggc aac tac aag acc c
 gc gca gag 336 Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu 1
 00 105 110 gtg aag ttc gag ggc gac acc ctg gtg aac cgc atc ga
 g ctg aag ggc 384 Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly 11
 5 120 125 atc gac ttc aag gag gac ggc aac atc ctg ggg cac
 aag ctg gag tac 432 Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr 130
 aac gtc tat atc atg 135 140 aac tac ggt gga tcc ggt gct agc aac agc cac
 aac gtc tat atc atg 480 Asn Tyr Gly Gly Ser Gly Ala Ser Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met 145

150	155	160	gcc gac aag aac gag aac ggc atc aag gtg a
ac ttc aag atc cgc cac	528 Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His		
165	170	175	aac atc gag gac ggc aac gtg gag ctc gc
c gac cac tac gag aac	576 Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn		
180	185	190	acc ccc atc ggg gac ggc ccc ggt ctg ctg
ctg ccc gac aac cac tac ctg	624 Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Le		
u 195	200	205	agc tac cag tcc gcc ctg agc aac
gac ccc aac gag aac cgc gat cac	672 Ser Tyr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn His Lys Arg Asp		
His 210	215	220	atg gtc ctg ctg gag ttc gtg a
cc gcc gcc ggg atc act ctc ggc atg	720 Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu		
Gly Met 225	230	235	240 gac gag ctg tac aag
taa	738 Asp Glu Leu Tyr Lys	738 Asp Glu Leu Tyr Lys	<210> 2 <211> 245 <21
245			
>> PRT <213> Aequorea victoria <400>	2 Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Le		
u 1 5	10	15	15 Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His L
ys Phe Ser Val Ser Gly	20	25	30 Glu Gly Glu Gly Asp Ala
Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile	35	40	45 Cys Thr Thr
Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr	50	55	60 Ph
e Gly Tyr Gly Leu Met Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys	65	70	7
5 80 Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu			
85 90 95 Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala			
Glu 100 105 110 Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg			
Ile Glu Leu Lys Gly 115 120 125 Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly As			
n Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr 130 135 140 Asn Tyr Gly Gly Ser G			
ly Ala Ser Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met 145 150 155 1			
60 Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His 165			
170 175 Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Glu Asn 180			
185 190 Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Le			
u 195 200 205 Ser Tyr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu L			
ys Arg Asp His 210 215 220 Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala			
Gly Ile Thr Leu Gly Met 225 230 235 240 Asp Glu Leu Tyr			
Lys 245 <210> 3 <211> 738 <212> DNA <213> Aequorea victoria <220> <221>			
CDS <222> (1)..(735) <223> Peridot DNA sequence <400> 3 atg gtc aac ggc gag gac ctg ttc acc			
ggg gtc gtc ccc atc ctg 1 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720 725 730 735 740 745 750 755 760 765 770 775 780 785 790 795 800 805 810 815 820 825 830 835 840 845 850 855 860 865 870 875 880 885 890 895 900 905 910 915 920 925 930 935 940 945 950 955 960 965 970 975 980 985 990 995 1000 1005 1010 1015 1020 1025 1030 1035 1040 1045 1050 1055 1060 1065 1070 1075 1080 1085 1090 1095 1100 1105 1110 1115 1120 1125 1130 1135 1140 1145 1150 1155 1160 1165 1170 1175 1180 1185 1190 1195 1200 1205 1210 1215 1220 1225 1230 1235 1240 1245 1250 1255 1260 1265 1270 1275 1280 1285 1290 1295 1300 1305 1310 1315 1320 1325 1330 1335 1340 1345 1350 1355 1360 1365 1370 1375 1380 1385 1390 1395 1400 1405 1410 1415 1420 1425 1430 1435 1440 1445 1450 1455 1460 1465 1470 1475 1480 1485 1490 1495 1500 1505 1510 1515 1520 1525 1530 1535 1540 1545 1550 1555 1560 1565 1570 1575 1580 1585 1590 1595 1600 1605 1610 1615 1620 1625 1630 1635 1640 1645 1650 1655 1660 1665 1670 1675 1680 1685 1690 1695 1700 1705 1710 1715 1720 1725 1730 1735 1740 1745 1750 1755 1760 1765 1770 1775 1780 1785 1790 1795 1800 1805 1810 1815 1820 1825 1830 1835 1840 1845 1850 1855 1860 1865 1870 1875 1880 1885 1890 1895 1900 1905 1910 1915 1920 1925 1930 1935 1940 1945 1950 1955 1960 1965 1970 1975 1980 1985 1990 1995 2000 2005 2010 2015 2020 2025 2030 2035 2040 2045 2050 2055 2060 2065 2070 2075 2080 2085 2090 2095 2100 2105 2110 2115 2120 2125 2130 2135 2140 2145 2150 2155 2160 2165 2170 2175 2180 2185 2190 2195 2200 2205 2210 2215 2220 2225 2230 2235 2240 2245 2250 2255 2260 2265 2270 2275 2280 2285 2290 2295 2300 2305 2310 2315 2320 2325 2330 2335 2340 2345 2350 2355 2360 2365 2370 2375 2380 2385 2390 2395 2400 2405 2410 2415 2420 2425 2430 2435 2440 2445 2450 2455 2460 2465 2470 2475 2480 2485 2490 2495 2500 2505 2510 2515 2520 2525 2530 2535 2540 2545 2550 2555 2560 2565 2570 2575 2580 2585 2590 2595 2600 2605 2610 2615 2620 2625 2630 2635 2640 2645 2650 2655 2660 2665 2670 2675 2680 2685 2690 2695 2700 2705 2710 2715 2720 2725 2730 2735 2740 2745 2750 2755 2760 2765 2770 2775 2780 2785 2790 2795 2800 2805 2810 2815 2820 2825 2830 2835 2840 2845 2850 2855 2860 2865 2870 2875 2880 2885 2890 2895 2900 2905 2910 2915 2920 2925 2930 2935 2940 2945 2950 2955 2960 2965 2970 2975 2980 2985 2990 2995 3000 3005 3010 3015 3020 3025 3030 3035 3040 3045 3050 3055 3060 3065 3070 3075 3080 3085 3090 3095 3100 3105 3110 3115 3120 3125 3130 3135 3140 3145 3150 3155 3160 3165 3170 3175 3180 3185 3190 3195 3200 3205 3210 3215 3220 3225 3230 3235 3240 3245 3250 3255 3260 3265 3270 3275 3280 3285 3290 3295 3300 3305 3310 3315 3320 3325 3330 3335 3340 3345 3350 3355 3360 3365 3370 3375 3380 3385 3390 3395 3400 3405 3410 3415 3420 3425 3430 3435 3440 3445 3450 3455 3460 3465 3470 3475 3480 3485 3490 3495 3500 3505 3510 3515 3520 3525 3530 3535 3540 3545 3550 3555 3560 3565 3570 3575 3580 3585 3590 3595 3600 3605 3610 3615 3620 3625 3630 3635 3640 3645 3650 3655 3660 3665 3670 3675 3680 3685 3690 3695 3700 3705 3710 3715 3720 3725 3730 3735 3740 3745 3750 3755 3760 3765 3770 3775 3780 3785 3790 3795 3800 3805 3810 3815 3820 3825 3830 3835 3840 3845 3850 3855 3860 3865 3870 3875 3880 3885 3890 3895 3900 3905 3910 3915 3920 3925 3930 3935 3940 3945 3950 3955 3960 3965 3970 3975 3980 3985 3990 3995 4000 4005 4010 4015 4020 4025 4030 4035 4040 4045 4050 4055 4060 4065 4070 4075 4080 4085 4090 4095 4100 4105 4110 4115 4120 4125 4130 4135 4140 4145 4150 4155 4160 4165 4170 4175 4180 4185 4190 4195 4200 4205 4210 4215 4220 4225 4230 4235 4240 4245 4250 4255 4260 4265 4270 4275 4280 4285 4290 4295 4300 4305 4310 4315 4320 4325 4330 4335 4340 4345 4350 4355 4360 4365 4370 4375 4380 4385 4390 4395 4400 4405 4410 4415 4420 4425 4430 4435 4440 4445 4450 4455 4460 4465 4470 4475 4480 4485 4490 4495 4500 4505 4510 4515 4520 4525 4530 4535 4540 4545 4550 4555 4560 4565 4570 4575 4580 4585 4590 4595 4600 4605 4610 4615 4620 4625 4630 4635 4640 4645 4650 4655 4660 4665 4670 4675 4680 4685 4690 4695 4700 4705 4710 4715 4720 4725 4730 4735 4740 4745 4750 4755 4760 4765 4770 4775 4780 4785 4790 4795 4800 4805 4810 4815 4820 4825 4830 4835 4840 4845 4850 4855 4860 4865 4870 4875 4880 4885 4890 4895 4900 4905 4910 4915 4920 4925 4930 4935 4940 4945 4950 4955 4960 4965 4970 4975 4980 4985 4990 4995 5000 5005 5010 5015 5020 5025 5030 5035 5040 5045 5050 5055 5060 5065 5070 5075 5080 5085 5090 5095 5100 5105 5110 5115 5120 5125 5130 5135 5140 5145 5150 5155 5160 5165 5170 5175 5180 5185 5190 5195 5200 5205 5210 5215 5220 5225 5230 5235 5240 5245 5250 5255 5260 5265 5270 5275 5280 5285 5290 5295 5300 5305 5310 5315 5320 5325 5330 5335 5340 5345 5350 5355 5360 5365 5370 5375 5380 5385 5390 5395 5400 5405 5410 5415 5420 5425 5430 5435 5440 5445 5450 5455 5460 5465 5470 5475 5480 5485 5490 5495 5500 5505 5510 5515 5520 5525 5530 5535 5540 5545 5550 5555 5560 5565 5570 5575 5580 5585 5590 5595 5600 5605 5610 5615 5620 5625 5630 5635 5640 5645 5650 5655 5660 5665 5670 5675 5680 5685 5690 5695 5700 5705 5710 5715 5720 5725 5730 5735 5740 5745 5750 5755 5760 5765 5770 5775 5780 5785 5790 5795 5800 5805 5810 5815 5820 5825 5830 5835 5840 5845 5850 5855 5860 5865 5870 5875 5880 5885 5890 5895 5900 5905 5910 5915 5920 5925 5930 5935 5940 5945 5950 5955 5960 5965 5970 5975 5980 5985 5990 5995 6000 6005 6010 6015 6020 6025 6030 6035 6040 6045 6050 6055 6060 6065 6070 6075 6080 6085 6090 6095 6100 6105 6110 6115 6120 6125 6130 6135 6140 6145 6150 6155 6160 6165 6170 6175 6180 6185 6190 6195 6200 6205 6210 6215 6220 6225 6230 6235 6240 6245 6250 6255 6260 6265 6270 6275 6280 6285 6290 6295 6300 6305 6310 6315 6320 6325 6330 6335 6340 6345 6350 6355 6360 6365 6370 6375 6380 6385 6390 6395 6400 6405 6410 6415 6420 6425 6430 6435 6440 6445 6450 6455 6460 6465 6470 6475 6480 6485 6490 6495 6500 6505 6510 6515 6520 6525 6530 6535 6540 6545 6550 6555 6560 6565 6570 6575 6580 6585 6590 6595 6600 6605 6610 6615 6620 6625 6630 6635 6640 6645 6650 6655 6660 6665 6670 6675 6680 6685 6690 6695 6700 6705 6710 6715 6720 6725 6730 6735 6740 6745 6750 6755 6760 6765 6770 6775 6780 6785 6790 6795 6800 6805 6810 6815 6820 6825 6830 6835 6840 6845 6850 6855 6860 6865 6870 6875 6880 6885 6890 6895 6900 6905 6910 6915 6920 6925 6930 6935 6940 6945 6950 6955 6960 6965 6970 6975 6980 6985 6990 6995 7000 7005 7010 7015 7020 7025 7030 7035 7040 7045 7050 7055 7060 7065 7070 7075 7080 7085 7090 7095 7100 7105 7110 7115 7120 7125 7130 7135 7140 7145 7150 7155 7160 7165 7170 7175 7180 7185 7190 7195 7200 7205 7210 7215 7220 7225 7230 7235 7240 7245 7250 7255 7260 7265 7270 7275 7280 7285 7290 7295 7300 7305 7310 7315 7320 7325 7330 7335 7340 7345 7350 7355 7360 7365 7370 7375 7380 7385 7390 7395 7400 7405 7410 7415 7420 7425 7430 7435 7440 7445 7450 7455 7460 7465 7470 7475 7480 7485 7490 7495 7500 7505 7510 7515 7520 7525 7530 7535 7540 7545 7550 7555 7560 7565 7570 7575 7580 7585 7590 7595 7600 7605 7610 7615 7620 7625 7630 7635 7640 7645 7650 7655 7660 7665 7670 7675 7680 7685 7690 7695 7700 7705 7710 7715 7720 7725 7730 7735 7740 7745 7750 7755 7760 7765 7770 7775 7780 7785 7790 7795 7800 7805 7810 7815 7820 7825 7830 7835 7840 7845 7850 7855 7860 7865 7870 7875 7880 7885 7890 7895 7900 7905 7910 7915 7920 7925 7930 7935 7940 7945 7950 7955 7960 7965 7970 7975 7980 7985 7990 7995 8000 8005 8010 8015 8020 8025 8030 8035 8040 8045 8050 8055 8060 8065 8070 8075 8080 8085 8090 8095 8100 8105 8110 8115 8120 8125 8130 8135 8140 8145 8150 8155 8160 8165 8170 8175 8180 8185 8190 8195 8200 8205 8210 8215 8220 8225 8230 8235 8240 8245 8250 8255 8260 8265 8270 8275 8280 8285 8290 8295 8300 8305 8310 8315 8320 8325 8330 8335 8340 8345 8350 8355 8360 8365 8370 8375 8380 8385 8390 8395 8400 8405 8410 8415 8420 8425 8430 8435 8440 8445 8450 8455 8460 8465 8470 8475 8480 8485 8490 8495 8500 8505 8510 8515 8520 8525 8530 8535 8540 8545 8550 8555 8560 8565 8570 8575 8580 8585 8590 8595 8600 8605 8610 8615 8620 8625 8630 8635 8640 8645 8650 8655 8660 8665 8670 8675 8680 8685 8690 8695 8700 8705 8710 8715 8720 8725 8730 8735 8740 8745 8750 8755 8760 8765 8770 8775 8780 8785 8790 8795 8800 8805 8810 8815 8820 8825 8830 8835 8840 8845 8850 8855 8860 8865 8870 8875 8880 8885 8890 8895 8900 8905 8910 8915 8920 8925 8930 8935 8940 8945 8950 8955 8960 8965 8970 8975 8980 8985 8990 8995 9000 9005 9010 9015 9020 9025 9030 9035 9040 9045 9050 9055 9060 9065 9070 9075 9080 9085 9090 9095 9100 9105 9110 9115 9120 9125 9130 9135 9140 9145 9150 9155 9160 9165 9170 9175 9180 9185 9190 9195 9200 9205 9210 9215 9220 9225 9230 9235 9240 9245 9250 9255 9260 9265 9270 9275 9280 9285 9290 9295 9300 9305 9310 9315 9320 9325 9330 9335 9340 9345 9350 9355 9360 9365 9370 9375 9380 9385 9390 9395 9400 9405 9410 9415 9420 9425 9430 9435 9440 9445 9450 9455 9460 9465 9470 9475 9480 9485 9490 9495 9500 9505 9510 9515 9520 9525 9530 9535 9540 9545 9550 9555 9560 9565 9570 9575 9580 9585 9590 9595 9600 9605 9610 9615 9620 9625 9630 9635 9640 9645 9650 9655 9660 9665 9670 9675 9680 9685 9690 9695 9700 9705 9710 9715 9720 9725 9730 9735 9740 9745 9750 9755 9760 9765 9770 9775 9780 9785 9790 9795 9800 9805 9810 9815 9820 9825 9830 9835 9840 9845 9850 9855 9860 9865 9870 9875 9880 9885 9890 9895 9900 9905 9910 9915 9920 9925 9930 9935 9940 9945 9950 9955 9960 9965 9970 9975 9980 9985 9990 9995 10000 10005 10010 10015 10020 10025 10030 10035 10040 10045 10050 10055 10060 10065 10070 10075 10080 10085 10090 10095 10100 10105 10110 10115 10120 10125 10130 10135 10140 10145 10150 10155 10160 10165 10170 10175 10180 10185 10190 10195 10200 10205 10210 10215 10220 10225 10230 10235 10240 10245 10250 10255 10260 10265 10270 10275 10280 10285 10290 10295 10300 10305 10310 10315 10320 10325 10330 10335 10340 10345 10350 10355 10360 10365 10370 10375 10380 10385 10390 10395 10400 10405 10410 10415 10420 10425 10430 10435 10440 10445 10450 10455 10460 10465 10470 10475 10480 10485 10490 10495 10500 10505 10510 10515 10520 10525 10530 10535 10540 10545 10550 10555 10560 10565 10570 10575 10580 10585 10590 10595 10600 10605 10610 10615 10620 10625 10			

agc tac cag tcc gcc ctg agc aaa gac ccc aac gag aag cgc gat cac
 Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His 210 215
 atg gtc ctg ctg gag ttc gtg acc gcc ggg atc act atc ggc atg
 Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr lle Gly Met 225 230
 40 gac gag ctg tac aag taa 245
 <210> 4 <211> 245 <212> PRT <213> Acquorea victoria <400> 4 Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Le
 u Phe Thr Gly Val Val Pro lle Leu 1 5 10 15 Val Glu L
 eu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly 20 25
 30 Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe lle 35 40
 45 Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr 50
 55 60 Phe Gly Tyr Gly Leu Met Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys 65
 70 75 80 Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly T
 yr Val Glu Glu 85 90 95 Arg Thr lle Phe Phe Lys Asp
 Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu 100 105 110 Val Lys Phe
 Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg lle Glu Leu Lys Gly 115 120 125
 lle Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn lle Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr 130 135
 140 Asn Tyr Gly Gly Ser Gly Ala Ser Asn er His Asn Val Tyr lle Met 145 150
 Gln Lys Asn Gly lle Lys Val Asn Phe Lys lle Arg His 165 170
 175 Asn lle Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn 180
 185 190 Thr Pro lle Gly Asp Gly Leu Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu 195
 200 205 Ser Tyr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His
 210 215 220 Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly lle Thr lle
 Gly Met 225 230 235 240 Asp Glu Leu Tyr Lys
 245